

赤霉素 GA₄₊₇ 处理下白桦无性系生长及 差异基因表达分析

刘宇, 徐焕文, 刘桂丰, 姜静*

(林木遗传育种国家重点实验室, 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: [目的] 为研究赤霉素 GA₄₊₇ 对白桦生长的调控机制。[方法] 试验利用 1 个白桦无性系的分株材料, 连续 2 年分别叶面喷施浓度为 0.2 g · L⁻¹ (T1)、0.4 g · L⁻¹ (T2) 的 GA₄₊₇ 溶液, 对实验苗木的生长情况进行跟踪调查, 并对相应顶端生长组织进行转录组测序和差异基因分析。[结果] 对 2 个年份的苗高、地径等性状分析发现, 不同处理间苗高与地径的差异均达到显著或极显著水平, GA₄₊₇ 对高生长有明显的促进作用, 2 年后的 T2 白桦苗高较 CK 提高了 19.65%。于 6 月 28 日取 GA₄₊₇ 连续处理 2 年的白桦顶芽开展 RNA-seq 分析, 结果显示: 0.4 g · L⁻¹ GA₄₊₇ (T2) 处理与对照 (CK) 间的差异基因数量最多, 即上调表达的基因有 181 个, 下调表达的基因有 55 个, 这些差异基因在叶绿体类囊体膜、红光、远红光及蓝光的细胞响应等方面富集明显。Pathway 富集分析显示: 氧化磷酸化途径与光合途径中的 8 条基因呈上调表达, 认为施加 0.4 g · L⁻¹ GA₄₊₇ 处理后, 上述基因的上调表达加快电子传递进程、催化 ATP 的合成, 从而促进白桦光合作用增强, 提高苗期生长量。[结论] 对白桦外源施加赤霉素 GA₄₊₇ 后, 可上调氧化磷酸化途径和光合途径相关基因的表达, 进而促进苗木的高和地径生长。研究结果可为白桦生长相关途径基因的克隆提供参考。

关键字: GA₄₊₇; 白桦无性系; 转录组; 生长

中图分类号: S792.153

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)01-0181-09

Analysis of Clonal Growth and Differences in Gene Expression of *Betula platyphylla* × *B. pendula* under GA₄₊₇ Treatment

LIU Yu, XU Huan-wen, LIU Gui-feng, JIANG Jing

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] To explore the regulation mechanism of gibberellin GA₄₊₇ on the growth of birch. [Method] The experiment was carried out by using two treatments from a tissue-cultured plantlet. The leaf surface was treated by foliar spraying GA₄₊₇ solution with concentrations of 0.2 g · L⁻¹ (T1) and 0.4 g · L⁻¹ (T2) for two consecutive years, respectively. Then the differential gene and transcriptome sequencing of the corresponding top growth tissue were analyzed. [Result] It was found that the difference of height and ground diameter of the plantlet under different treatments reached significant or extremely significant level after two years. It is proved that the GA₄₊₇ has a significant promoting effect on height growth. The height of birch seedlings under T2 treatment increased by 19.65% compared with the CK. The results of RNA-seq analysis of birch bud for treated by GA₄₊₇ for continuous 2 years showed that the number of different gene was the most between the 0.4 g · L⁻¹ of GA₄₊₇ (T2) treatment and the CK, a total of 181 up-regulated expression genes and 55 down-regulated expression genes were observed. These genes presented significantly enrichment in the chloroplast thylakoid membrane, red light and far red light and blue light cell response. Pathway enrichment analysis showed that 8 genes in the oxidative phosphorylation pathway and

收稿日期: 2015-12-23

基金项目: 珍贵用材树种新品种选育技术研究(2012BAD01B05)。

作者简介: 刘宇(1990—), 男(汉族), 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种研究

* 通讯作者: 姜静(1960—), 女(汉族), 黑龙江哈尔滨人, 教授, 主要从事林木遗传育种研究。

photosynthetic pathway were up-regulated, indicating that applying on $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_{4+7}$ treatment, the up-regulated gene expression above promoted the electron transfer process, catalyzing ATP synthesis, thereby promoting birch photosynthetic enhancement, and improved seedling growth. [Conclusion] The application of exogenous gibberellin GA_{4+7} can upregulate the expression of related genes, which participates oxidative phosphorylation pathway and photosynthetic pathway, thus contributing to seedling height and diameter growth.

Keywords: GA_{4+7} , birch clones, transcriptome, growth

赤霉素是控制植物生长并作用于植物整个生命周期的一种激素,属于四环二萜类化合物。目前已知的赤霉素种类至少有130种,但仅有部分赤霉素的活性较高, GA_4 与 GA_7 是其中活性很高的两种。由于这两种赤霉素分子结构相似,分离困难,常以混合物即 GA_{4+7} 的形式存在^[1]。迄今为止,有关 GA_{4+7} 影响树木生长报道最多的是促进杉科(Taxodiaceae)、松科(Pinaceae)等针叶树种开花结实的研究^[2-5]。如Almqvist等^[6]人采用 GA_{4+7} 茎干注射处理21年生的挪威云杉(*Picea abies*),显著增加了雌雄花的数量;赵鹏等^[7]对15年生落叶松喷洒 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的赤霉素 GA_{4+7} ,喷洒的枝条雌球花量是对照枝条的2.9倍。另外,在果树中研究发现, GA_{4+7} 有效促进植株营养生长,并且大幅提高开花率及座果率^[8-9]。目前, GA_{4+7} 在植物生长调节和促进开花结实两方面所起的作用已被证实,但是在国内利用 GA_{4+7} 促进阔叶用材树种的生长相关报道还较少,主要集中在施加 GA_3 或其它易于提取的赤霉素,研究其对植物的生长影响,其主要原因是由于 GA_{4+7} 难以获得,且生产价格昂贵,限制了其广泛应用^[1],所以 GA_{4+7} 对于阔叶树种的处理方式、处理时间以及作用效果尚未明确。但随着 GA_{4+7} 合成途径的确定,生产菌株的获得,使其使用成本大幅减少,大大推动 GA_{4+7} 在针阔叶树种中的应用。因此本试验以1个白桦(*B. platyphylla* × *B. pendula*)无性系为研究对象,采用不同浓度赤霉素 GA_{4+7} 处理,在生长最旺盛的6月末取材测定基因的转录组,目的是为了研究 GA_{4+7} 对白桦生长的影响及分子机制,也为 GA_{4+7} 在白桦中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2013年于东北林业大学白桦强化种子园内选择1株干型挺直无病虫害的杂种白桦(*B. platyphylla* × *B. pendula*)优树的下部枝条,带回实验室后将枝条切断,流水冲洗2 d,摘取枝条上腋芽置于70%乙醇中1 min,无菌水漂洗1 min,于超净台上剥去外层芽鳞,0.1% (W/V) HgCl_2 中浸泡8 min,10%的次

氯酸钙 $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 中10 min,无菌水漂洗3~5次。消毒后的腋芽接种到WPM + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-氨基嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA)中进行初代培养,30 d后转接至WPM + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA中进行不定芽的继代培养,2013年3月,将组培苗进行生根培养,5月中旬移栽至育苗盘中,置于温室中常规管理,6月初选取高度一致的白桦苗木,移栽至 $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ 的花盆中,置于东北林业大学白桦育种基地进行常规水肥管理。

1.2 方法

参考Philipson的方法^[10]设置 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_{4+7}$ (T1处理)、 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_{4+7}$ (T2处理)2种浓度,以不喷施任何溶液为空白对照(CK),每个处理9株,共计27株白桦无性系。2014年4月20日至7月20日期间对参试苗木进行叶面喷施处理,每隔15 d处理1次,10月初待苗木封顶时调查1年生苗高、地径。2015年4月20日开始重复上述 GA_{4+7} 处理,并于2015年6月28日分别取T1、T2、CK的白桦顶端组织(包含顶芽及第一片幼叶),迅速置于液氮中带回实验室。10月初待苗木封顶时调查2年生苗高、地径。

1.2.1 RNA的提取及cDNA文库的构建 采用CTAB法提取样品总RNA后,用DNase I (Promega, USA)消化去除DNA污染,采用Qubit 2.0、Agilent 2100方法检测RNA样品的纯度、浓度和完整性,从3个RNA样品中各取20 μg 由百迈克生物科技有限公司进行cDNA文库的构建。分别使用Qubit2.0和Agilent 2100 Bioanalyzer对文库的浓度和插入片段大小进行检测,使用Q-PCR方法对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。库检合格后,用HiSeq2500进行测序并进行有参考基因组的转录组分析。

将测序所得Raw Data去除测序接头以及引物序列,过滤低质量值数据,获得高质量的Clean Data。将其与白桦基因组进行比对,比对上的reads称为Mapped Data。通过检验插入片段在基因组上的分布,评估mRNA片段化的随机性及mRNA的降解情况;通过插入片段的长度分布,评估插入片段长度的

离散程度;通过绘制饱和度图,评估文库质量。

1.2.2 差异基因的筛选、GO、pathway 分析 使用 EBSseq 进行差异表达分析,获得 2 个样品之间的差异表达基因集,采用 RPKM (Reads Per Kb per Million reads) 作为衡量转录本或基因表达水平的指标^[11],计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差异。在差异表达基因检测过程中,将 Fold Change ≥ 2 且 FDR (false discovery rate) < 0.01 作为筛选标准定义差异表达基因。得到差异表达基因之后,对差异表达基因做 GO 功能分析和 KEGG Pathway 分析。

RPKM 计算公式为:

$$RPKM = 10^6 C / (NL / 10^3)$$

设 RPKM(A) 为 geneA 的表达量,则 C 为唯一比对到 gene A 的 reads 数,N 为唯一比对到所有 gene 的总 reads 数,L 为 gene A 的碱基数,RPKM 法能消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响。

1.2.3 qRT-PCR 验证 采用 CTAB 法分别提取 T1、T2 以及 CK 白桦顶端分生组织的总 RNA,经 DNaseI (RNase free) 消化后使用 ReverTre Ace[®] qPCR RT Kit (Toyobo, Osaka, Japan) 将提取的总 RNA 进行反转录。反转录产物稀释 10 倍,用作定量 PCR 的模板,以 *BpUBC* 和 *BpSAND* 作为内参基因,进行实时定量 PCR 扩增(所有试样进行 3 次重复)。PCR 的反应体系为:SYBR[®] Premix ExTaqTM II (2 \times) 10 μ L,引物各 1 μ L (10 μ mol \cdot L⁻¹),水 6 μ L,模板 2 μ L,反应参数为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,58 $^{\circ}$ C 退火延伸 34 s,循环 40 次,绘制溶解曲线,温度由 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,至 95 $^{\circ}$ C 15 s 止。以上反应在 ABI PRISM[®] 7500 荧光定量 PCR 仪上完成。选取未处理白桦(CK)作为对照,用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法^[12]对定量 PCR 的结果进行分析,引物序列见表 1。

1.3 遗传参数分析

表型变异系数(PCV)采用公式: $PCV = \delta / \bar{X} \times 100\%$, δ 为性状标准差, \bar{X} 为性状平均值^[13]。

运用 Microsoft Excel 进行数据处理,用 SPSS v16.0 软件进行方差分析及多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同浓度赤霉素 GA₄₊₇对白桦无性系生长的影响

对 GA₄₊₇处理白桦无性系获得的 2 个年度生长性状进行方差分析以及主要遗传参数分析(表 2)。在第 1 个年度,发现不同浓度的 GA₄₊₇对苗高的生长有极显著促进作用($P < 0.01$),而对地径的影响

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因 Gene	上游序列 Upstream sequence(5'-3')	下游序列 Downstream sequence(5'-3')
<i>BpUBC</i>	GGTTTCTGGGTTACAGTA-AAGTTTCAG	CTTGAAGCCTGCATGTGGTC
<i>BpSAND</i>	CACAGAAGAGCCT-TACGAGTCAT	CCTCCAAGCAAAGATGT-CATATCAAAC
BP028367	GGTACTGTGCGGGC-CAAGC	CAATGGCTCCTCCGCTAGT-TCTTC
BP028372	GCTCATAAAGGTCCATT-TACAGGCCAGGG	GGATAAGGGGCATCGAAT-ACATATGG
BP028382	CCTCGGGATCAAATTGGT-TATTGGGCAG	GGATTGTCTACACTAG-CACTTCCGGC
BP029736	GAATCCACTGATTTCCTGC-CGCTTCCG	GCTTCGGGCTGTCTCGCGATC
BP028323	CCATTACTGATGGA-CAAATCTGTTCGG	CTACCCGACACTTGTTCAT-AGCTTTC
BP028346	CATAGATCACCCCTATT-TGTGTGTCGG	CGGTTAATAACATGGTAAT-GCCCCTGCC
BP028374	CCGATTCTTATAGTACTGT-TCGGGGAG	GCTTCCGGTTTAGGTGGA-CAGCC
BP028387	ATCCCGAAAACGGC-CCGGGTCC	CCTCTAGAGTAGGTATG-GCATCGCC

不明显($P > 0.05$);在连续处理的第 2 个年度,GA₄₊₇不但延续了对高生长的极显著促进作用($P < 0.01$),而且对地径生长的促进作用也达到了显著水平($0.01 < P < 0.05$),说明白桦无性系苗高对 GA₄₊₇反应较敏感,而地径对 GA₄₊₇反应较迟钝。进一步对各性状遗传参数分析发现,苗高与地径性状的表型变异系数均随处理时间延长而减小并且均小于 25.00%,说明无性系生长逐渐趋于稳定并且整齐度较好。

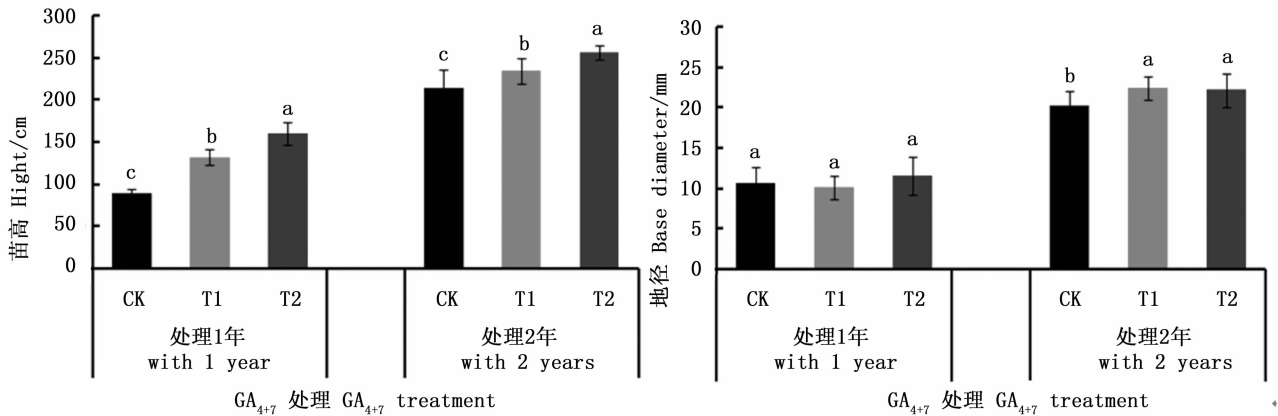
对各处理的生长性状进行多重比较发现(见图 1),白桦的苗高生长在各处理间的差异达到显著水平($0.01 < P < 0.05$),在 2 个年度内均表现为随着 GA₄₊₇浓度的提高其生长也加大,其中 GA₄₊₇处理 2 年后,T2、T1 处理的白桦无性系分别高于 CK 的 19.65%、9.05%。在地径方面,赤霉素 GA₄₊₇处理第 1 年后对苗木的地径生长影响差异不显著,但在处理第 2 年后表现出明显差异,2 种浓度处理(T1、T2)苗木地径均显著高于对照(CK)苗木地径(图 1)。

2.2 不同浓度 GA₄₊₇处理下白桦转录组数据统计及文库质量评价

对 CK、T1、T2 等白桦样品测序数据评估显示,Q30 碱基百分比均不低于 91.94%,并且 3 个样品与基因组的比对率在 79.00% 以上,说明转录组数据满足后续信息分析的需求及数据分析的可靠性。通

表2 赤霉素 GA₄₊₇处理白桦无性系苗高、地径方差分析及主要遗传参数
Table 2 Analysis of variance and genetic parameters among gibberellin GA₄₊₇ treatment birch clones on height and base diameter

性状 Growth traits	年龄 Age/a	变异来源 Source of variation	df	MS	F	P	均值 Mean	标准差 Standard deviation	变幅 Amplitude of variation	PCV/%
苗高 Height/m	1	处理间	2	11 663.59	112.63 **	<0.01	127.41	31.51	78.00 ~ 175.00	24.73
		处理内	24	103.556						
	2	处理间	2	4 019.444	15.288 **	<0.01	235.44	23.49	180.00 ~ 269.00	9.98
		处理内	24	262.907						
地径 Base diameter/mm	1	处理间	2	5.205	1.32	0.286	10.76	2.01	8.23 ~ 15.84	18.68
		处理内	24	3.948						
	2	处理间	2	12.577	3.844 *	0.036	21.65	2.00	17.24 ~ 25.49	9.24
		处理内	24	3.272						



注:图中 a、b 和 c 表示差异显著程度,不同字母表示差异显著 ($n = 3, P < 0.05$, Duncan 多重比较分析,误差线表示标准偏差),相同字母表示差异不显著

Note: a, b and c in the figure showed significant difference degree, different letters mean significant difference ($n = 3, P < 0.05$, Duncan multiple comparison analysis, error line shows the standard deviation), the same letter indicates no significant difference.

图1 赤霉素 GA₄₊₇处理白桦无性系苗高、地径生长情况

Fig. 1 Height and base diameter growth of gibberellin GA₄₊₇ treatment birch clonal

通过对插入片段在基因组上的分布及插入片段的长度分布进行检测、饱和图的绘制,表明该转录组文库可以用于后续转录组测序。

表3 样品测序数据统计及比对效率

Table 3 Samples sequencing data statistics and mapped ratio

样品 Samples	GC 百分比/% The GC percentage	% ≥ Q30	与参考基因组的比对率/% Mapped ratio/%
CK	46.70	92.86	79.69
T1	46.72	92.40	79.87
T2	47.07	91.94	80.42

2.3 不同浓度 GA₄₊₇处理下白桦无性系的差异表达基因

根据 RPKM 获得 CK、T1、T2 处理的白桦 3 个样本转录组文库的基因表达量,比较每 2 样本间的差异表达基因(图 2),CK_vs_T1 有 145 个差异基因(95 个上调,50 个下调),CK_vs_T2 有 236 个差异基因(181 个上调,55 个下调),T1_vs_T2 有 82 个差异

基因(46 个上调,36 个下调),其中 T1_vs_T2 的差异基因最少。绘制维恩图分析 3 个处理差异表达基因的分布(图 3),发现有 6 个基因在 CK_vs_T1、CK_vs_T2 和 T1_vs_T2 中均有表达。

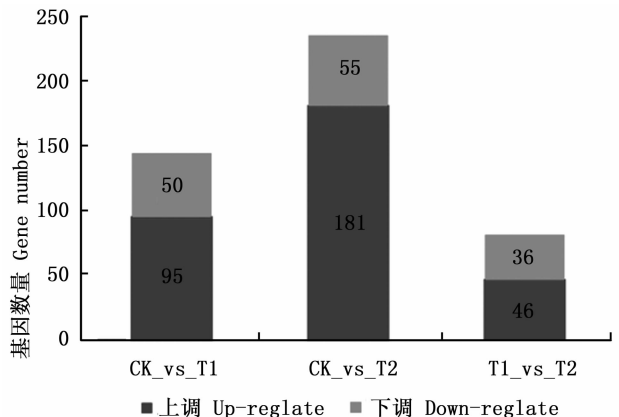


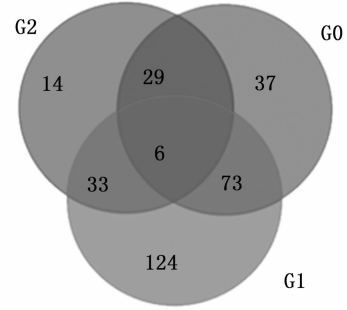
图2 不同处理间上调和下调差异基因数量

Fig. 2 The number of up-regulated and down-regulated differential expressed genes between the different treatments

_T2、T1_vs_T2 间差异表达,有 29 个基因在 CK_vs_T1 和 T1_vs_T2 中差异表达,有 33 个基因在 CK_vs_T2 和 T1_vs_T2 中差异表达,有 73 个基因在 CK_vs_T1 和 CK_vs_T2 中差异表达。

2.4 差异基因的 GO 分类及富集分析

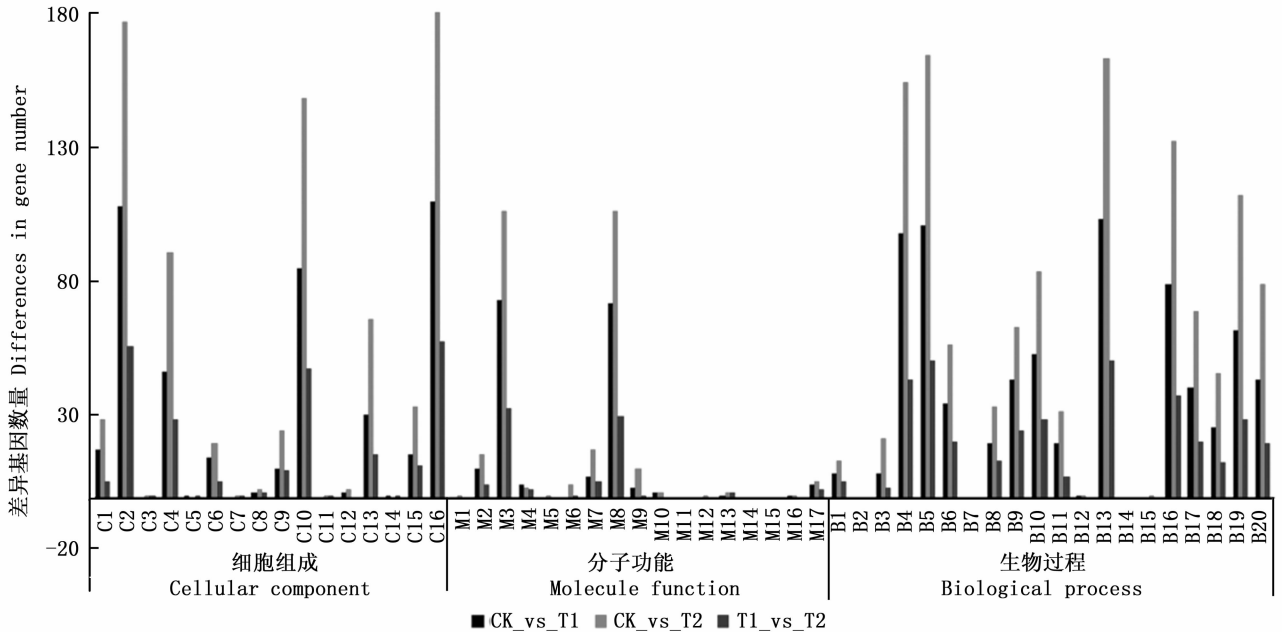
GO 功能显著性富集分析能确定差异表达基因行使的主要生物学功能,可将基因分为细胞组成、生物过程、分子功能 3 个大类,因此对 3 个处理的差异表达基因进行了功能分类,结果见图 4。差异表达基因主要集中在细胞组成的细胞 (cell)、细胞器 (organelle)、细胞部分 (cell part); 分子功能的催化活性



其中 G0: CK_vs_T1; G1: CK_vs_T2; G2: T1_vs_T2

图 3 不同处理下白桦差异表达基因维恩图

Fig. 3 Venn diagram of differentially expressed genes of birch under different treatments



注:细胞组成:C1 胞外区,C2 细胞,C3 拟核,C4 细胞膜,C5 病毒体,C6 细胞连接,C7 细胞外基质,C8 膜包围的内腔,C9 高分子复合物,C10 细胞器,C11 细胞外部分基质,C12 细胞外部分基质,C13 部分细胞器,C14 部分病毒体,C15 部分细胞膜,C16 部分细胞。分子功能:M1 蛋白结合转录因子活性,M2 核酸结合转录因子活性,M3 催化活性,M4 受体活性,M5 甲脒基核苷酸交换因子活性,M6 结构因子活性,M7 运输活性,M8 结合,M9 电子载体活性,M10 抗氧化活性,M11 通道调控活性,M12 金属伴侣活性,M13 酶调节活性,M14 标签蛋白,M15 翻译调节活性,M16 营养容量活性,M17 分子翻译活性。生物过程:B1 复制,B2 细胞杀伤,B3 免疫系统过程,B4 代谢过程,B5 细胞过程,B6 生殖过程,B7 生物附着,B8 信号,B9 多细胞有机体过程,B10 发育过程,B11 生长,B12 移动,B13 单一有机体过程,B14 生物学时期,B15 节律过程,B16 响应刺激,B17 定位,B18 多有机体过程,B19 生物调节,B20 细胞组成组织起源。

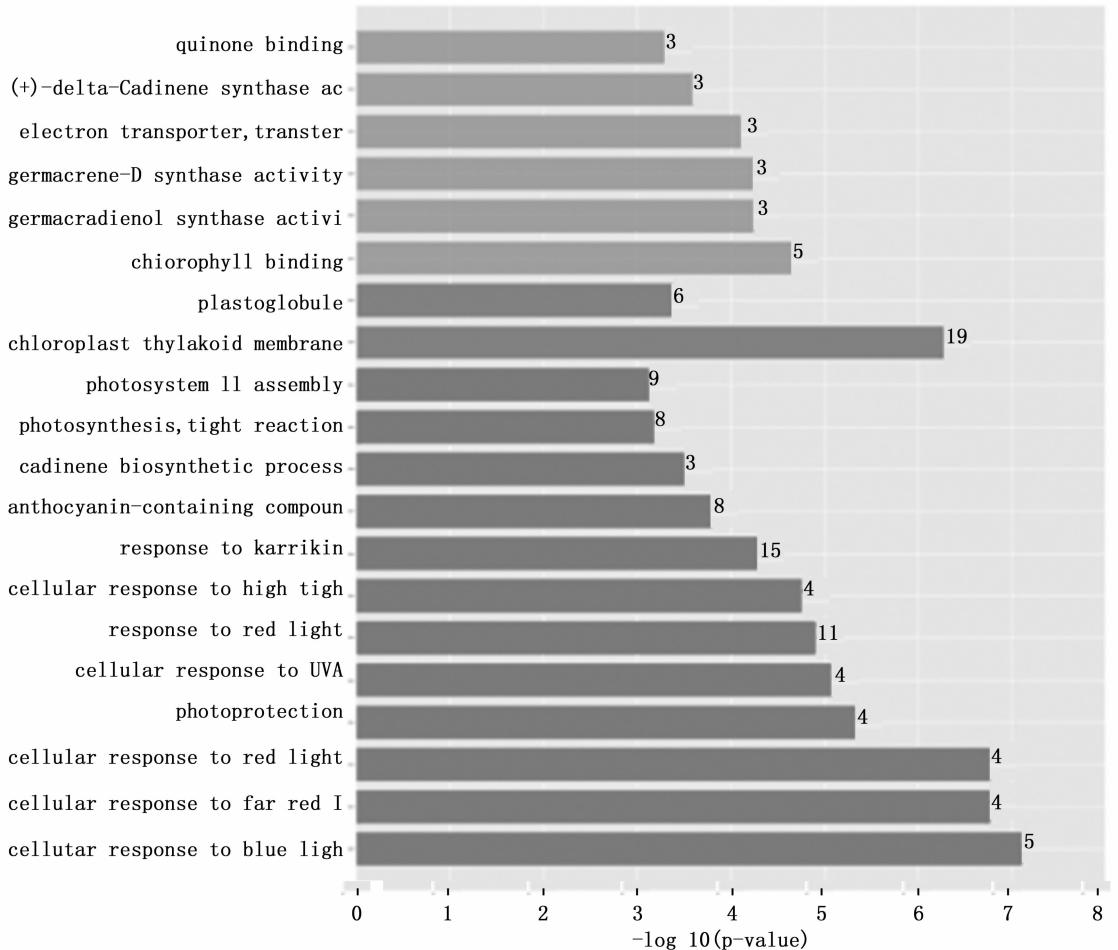
Note: Cellular component: extracellular region, cell, nucleoid, membrane, virion, cell junction, extracellular matrix, membrane-enclosed lumen, macromolecular complex, organelle, extracellular matrix part, extracellular region part, organelle part, virion part, membrane part, cell part. Molecule function: protein binding transcription factor activity, nucleic acid binding transcription factor activity, catalytic activity, receptor activity, guanyl-nucleotide exchange factor activity, structural molecule activity, transporter activity, binding, electron carrier activity, antioxidant activity, channel regulator activity, metallochaperone activity, enzyme regulator activity, protein tag, translation regulator activity, nutrient reservoir activity, molecular transducer activity. Biological process: reproduction, cell killing, immune system process, metabolic process, cellular process, reproductive process, biological adhesion, signaling, multicellular organismal process, developmental process, growth, locomotion, single-organism process, biological phase, rhythmic process, response to stimulus, localization, multi-organism process, biological regulation, cellular component organization or biogenesis.

图 4 不同样品间表达差异基因的 GO 分类

Fig. 4 GO classification of differentially expressed genes between the different birch samples

(catalytic activity)、结合(binding);生物过程的代谢过程(metabolic process)、细胞过程(cellular process)、单一有机体过程(single-organism process)、刺激响应(response to stimulus)、生物调控(biological regulation)。由图2可知,CK_vs_T1 的差异基因数量明显少于CK_vs_T2 的差异基因数量,说明施加高浓度的GA₄₊₇引起的差异基因数目增多。

对每2个处理样品间的差异基因进行GO富集分析,以CK_vs_T2为例(图5),差异基因在叶绿体类囊体膜(chloroplast thylakoid membrane)、红光的细胞响应(cellular response to red light)、远红光的细胞响应(cellular response to far red light)、蓝光的细胞响应(cellular response to blue light)等方面富集显著。



注:分子功能:醌结合活性、杜松烯合酶活性、电子运输转运活性、右旋大根香叶烯合酶活性、germacradienol 合酶活性、叶绿素结合;细胞组成:质体球、叶绿体类囊体膜;生物过程:光系统II组装、光合作用光反应、杜松烯生物合成过程、花青素组成、卡里金响应、高亮度细胞响应、红光响应、紫外光的细胞响应、光保护、红光的细胞响应、远红光的细胞响应、蓝光的细胞响应。

Note: Molecule function: quinone binding, (+) delta cadinene synthase activity, electronic transporter transfer activity, germacrene - D synthase activity, germacradienol synthase activity, chlorophyll II binding; Cellular component: plastoglobule, chloroplast thylakoid membrane; Biological process: photosystem II assembly, photosynthesis light reaction, cadinene biosynthesis process, anthocyanin - containing compound, response to karrikin, cellular response to high light, response to red light, cellular response to UV - A, photoprotection, cellular response to red light, cellular response to far red light, cellular response to blue light.

图5 CK_vs_T2 差异基因的富集分析

Fig.5 Analysis of CK_vs_T2 difference gene enrichment

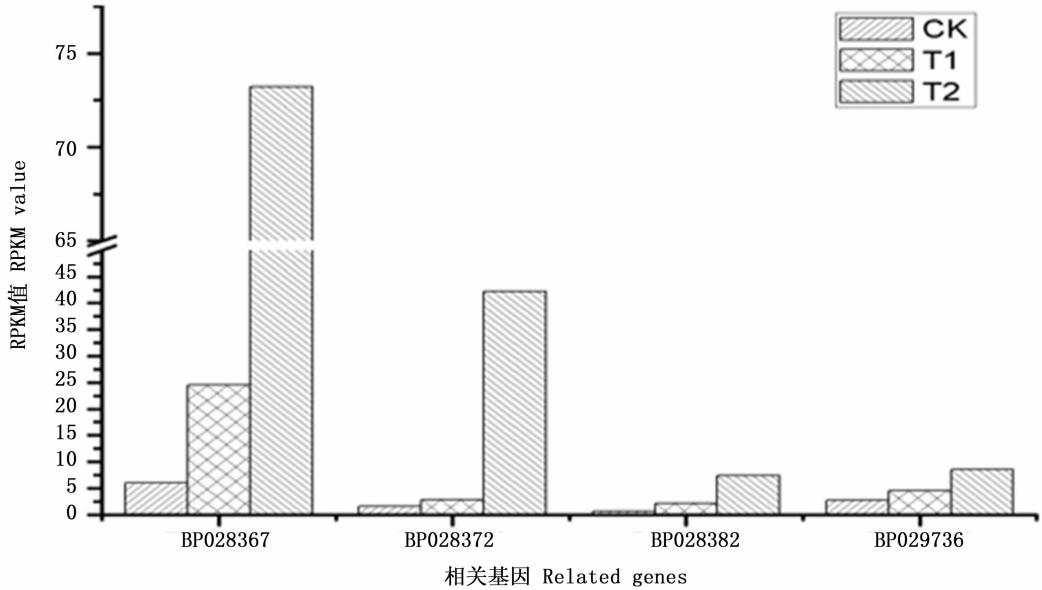
2.5 赤霉素处理下白桦无性系生长相关基因的初步分析

Pathway 显著性富集分析能确定差异表达基因

参与的主要生物过程,因此用KEGG数据库对差异基因进行Pathway富集分析,研究富集的主要生物学过程。

2.5.1 光合作用途径相关基因 根据白桦无性系生长情况发现,GA₄₊₇处理对白桦苗期高生长有显著促进作用,且 0.4 g · L⁻¹ GA₄₊₇对白桦的促进作用较 0.2 g · L⁻¹的促进作用更显著。由于植物生物量与光合作用呈正相关关系^[14],因此对光合作用途径相关基因进行深入挖掘。Pathway 富集分析结果显示:GA₄₊₇处理白桦苗木后,CK_vs_T2 的光合作用途

径有 4 个差异基因上调表达,基因的表达量见图 6,这些差异基因编码的蛋白分别是光系统 II 蛋白 D1 (photosystem II protein D1)、光系统 I P700 叶绿素 A 脱辅基蛋白 A2(photosystem I P700 chlorophyll A apoprotein A2)、细胞色素 b6f 亚组 4 (cytochrome b6-f complex subunit 4)、叶绿体中 CF1α 亚组 ATP 合成酶 (ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast))。



注:BP028367 编码光系统 II 蛋白 D1;BP028372 编码光系统 I P700 叶绿素 A 脱辅基蛋白 A2; BP028382 编码细胞色素 b6f 亚组 4;BP029736 编码叶绿体中 CF1α 亚组 ATP 合成酶。

Note: BP028367 II coding photosystem II protein D1;BP028372 coding photosystem I P700 chlorophyll A apoprotein A2;BP028382 coding cytochrome b6 - f complex subunit 4;BP029736 coding ATP synthase CF1 alpha subunit (chloroplast)

图 6 光合作用途径相关基因在不同样品间的表达水平

Fig.6 Related gene expression levels among different samples in photosynthesis pathway

2.5.2 氧化磷酸化途径相关基因 氧化磷酸化途径是有机物在分解过程中的氧化步骤所释放的能量,驱动 ATP 合成的过程,即 ATP 的生成过程,ATP 是植物的各项生命活动直接能源物质^[15]。Pathway 富集结果表明:CK_vs_T2 的氧化磷酸化途径有 4 个差异基因上调表达,基因的表达量见表 4,它们分别编码 ATP 合成酶 F1 亚组 1(ATP synthase F1 subunit 1)、细胞色素 c 氧化酶亚组 1 (cytochrome oxidase subunit 1)、NADH-质体醌氧化还原酶亚组 K (NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K)、NADH 钼氧化还原酶亚组 2 (NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 2)。

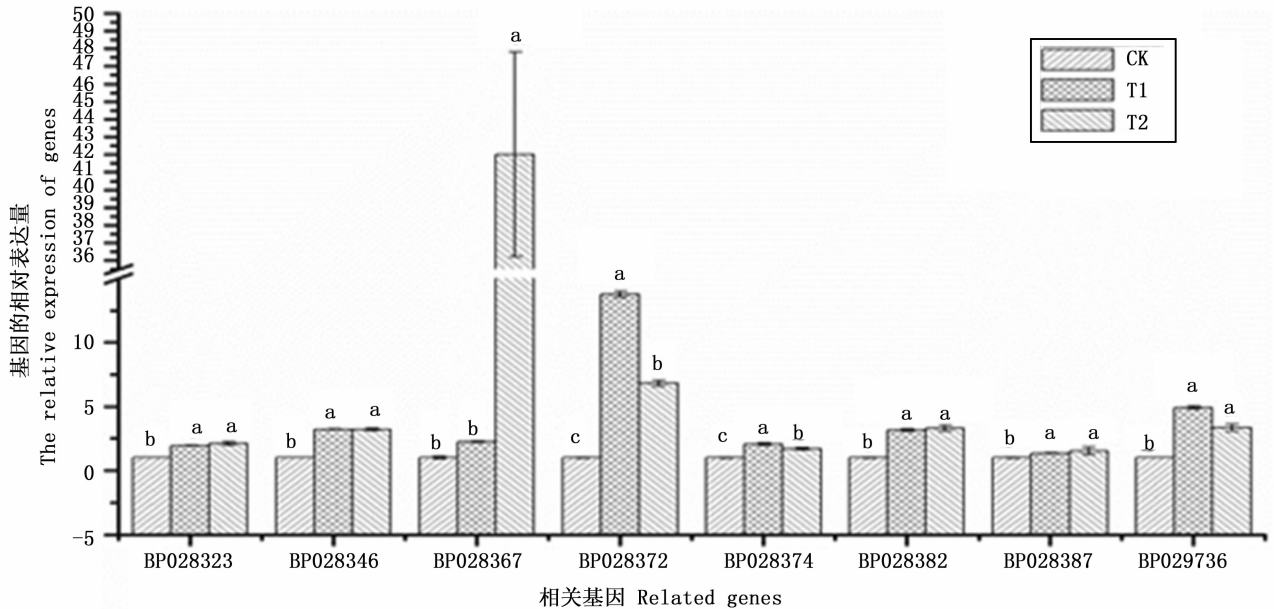
2.5.3 qRT-PCR 验证 为验证转录组测序结果的可靠性,分别以 T1、T2 和 CK 白桦顶尖组织的 RNA 为试材,对光合作用途径表达差异显著的 4 条基因

表 4 氧化磷酸化途径相关基因在不同处理间的表达水平 (RPKM 值)

Table 4 Related gene expression levels between different treatment in oxidative phosphorylation pathway (RPKM value)

基因样品 Gene samples	CK	T1	T2	编码的蛋白 Encoded proteins
BP028323	0.841	1.860	5.334	ATP 合成酶 F1 亚组 1
BP028346	0.065	0.293	0.841	细胞色素 c 氧化酶亚组 1
BP028374	4.907	11.468	15.583	NADH-质体醌氧化还原酶亚组 K
BP028387	10.183	53.625	128.167	NADH 钼氧化还原酶亚组 2

和氧化磷酸化途径表达差异显著的 4 条基因进行 qRT-PCR 分析,结果显示:与 CK 相比,T1、T2 中上述 8 条基因均呈上调表达,与 Illumina/Solexa 测序结果具有相同的表达趋势(图 7),说明测序结果是可靠的。



注:相对表达水平由实时定量PCR以 BpUBC 和 BpSAND 为内参计算而来,每个基因3次重复。

Note: the relative expression level by real-time quantitative PCR with BpUBC and BpSAND as reference genes to calculated, repeat 3 times each gene.

图7 实时定量PCR验证各样品之间候选基因的表达差异

Fig. 7 Real-time quantitative PCR to verify differentially expressed between each candidate gene samples

3 讨论

调节树木生长,使其短时间内获得较大生长增益从而缩短育种周期是林木育种的重要课题,人们通常采取施肥、环割、断根、施加外源激素等措施促进树木生长^[7,16-18]。试验证明,对于果材兼用树种施加 GA_{4+7} 在促进开花及生长、提高座果率方面效果显著,因此,备受育种工作者的重视^[8-9]。

为了探讨 GA_{4+7} 在促进白桦生长方面的作用,试验利用遗传组成完全相同的1个白桦无性系为材料,分别喷施 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_{4+7} ,结果表明,施加 GA_{4+7} 对白桦苗期生长具有促进作用,在苗高方面,2个浓度的 GA_{4+7} 均能显著促进苗高生长, $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_{4+7} 处理2年后无性系苗高均值分别高于CK的9.05%、19.65%;在地径方面,在 GA_{4+7} 连续处理2年后地径均值显著高于CK, GA_{4+7} 浓度为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对白桦苗期生长促进效果好。这一实验结果与 Bottini 等人^[9] 对苹果 (*Malus pumila*) 树的研究结果相吻合,即赤霉素促进植株的营养生长。

GA_{4+7} 处理下白桦无性系生长量的增加,必然与生长相关基因的上调表达密切相关,对白桦苗木生

长旺盛期的转录组测序也证明了 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_{4+7} (T2) 处理苗高增长显著,同时与对照 (CK) 之间差异基因的数量也最多,即上调表达的基因有181个,下调表达的基因有55个(图2),这些差异基因在叶绿体类囊体膜、红光、远红光及蓝光的细胞响应等方面富集明显(图5),进一步 Pathway 富集分析发现:叶绿体中 CF1 α 亚组 ATP 合成酶、细胞色素 b6f 亚组 4、光系统 II 蛋白 D1、光系统 I P700 叶绿素 A 脱辅基蛋白 A2 等4条光合代谢相关的基因呈上调表达,这些基因参与光合作用的光反应过程。另外还有氧化磷酸化途径的 ATP 合成酶 F1 亚组 1、细胞色素 c 氧化酶亚组 1、NADH-质体醌氧化还原酶亚组 K、NADH 脱氢酶亚组 2 等4条基因呈上调表达,上述8条基因表达量的升高,可能是通过加快电子传递过程、催化 ATP 的合成,而促进植物的光合作用增强^[19-25]。总之, GA_{4+7} 处理后白桦通过上调光合途径和氧化磷酸化途径的相关基因的表达,加快其细胞内有机物的合成,进而促进其苗高、地径的生长。由于参试的白桦无性系放置于塑料大棚外,按常规管理这些苗木进入开花结实期还需2~3年的时间, GA_{4+7} 处理后能否加快白桦营养生长向生殖生长转变进程还有待于后续研究,按照前期试验设计继续施加 GA_{4+7} ,观察试验组是否缩短童期、是否

增加开花数量提高种子产量,进而在基因表达水平上探讨 GA₄₊₇对白桦生长的影响。

4 结论

本研究外源施加赤霉素 GA₄₊₇可促进白桦苗木的高生长和地径生长。转录组测序结果表明:赤霉素 GA₄₊₇处理前后的差异基因主要富集在叶绿体类囊体膜、红光、远红光及蓝光的细胞响应等方面;同时赤霉素 GA₄₊₇可上调氧化磷酸化途径和光合途径相关基因的表达,研究结果可为深入了解赤霉素 GA₄₊₇对白桦生长的调控机制及生长相关途径重要基因的克隆提供参考。

参考文献:

- [1] 李佼佼,杨文革,胡永红. 赤霉素 A₄₊₇的分子生物学研究进展[J]. 河南农业科学,2013,42(5):1-4.
- [2] Paula M P. Eastern white pineflowering in response to spray application of gibberellin A_{4/7} or ProCone™[J]. Northern Journal of Applied Forestry, 2002,19(2):68-72.
- [3] Cherry M L, Anekonda T S, Albrecht M J, et al. Flower stimulation in young miniaturized seed orchards of Douglas-fir(*Pseudotsuga menziesii*) [J]. Canadian Journal of Forest Research, 2007,37(1):1-10.
- [4] Owens J N, Chandler L M, Bennett J S, et al. Cone enhancement in *Abies amabilis* using GA_{4/7}, fertilizer, girdling and tenting[J]. Forest Ecology and Management, 2001,154(2001):227-236.
- [5] 邵顺流,陈小荣,唐陆法,等. GA_{4/7}对百山祖冷杉开花促进和子代遗传活力恢复研究[J]. 浙江林业科技,2007,27(5):21-24.
- [6] Almqvist C. Timing of GA_{4/7} application and the flowering of *Pinus sylvestris* grafts in the greenhouse [J]. Tree Physiology, 2003,23(6):413-418.
- [7] 赵 鹏. 油松无性系种子园开花结实习性及激素处理促进成花的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007:38-46.
- [8] Curry E. Increase in epidermal planar cell density accompanies decreased russetting of 'golden delicious' apples treated with Gibberellin A₄₊₇[J]. HortScience, 2012,47(2):232-237.
- [9] Bottini R, Cassán F, Piccoli P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004,65(5):497-503.
- [10] Philipson J J. The promotion of flowering in large field-grown *Sitka spruce* by girdling and stem injections of gibberellin A_{4/7}[J]. Canadian Journal of Forest Research, 1985,15(1):166-170.
- [11] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nature Methods,

2008,5(7):621-628.

- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method[J]. Methods, 2001,25(4):402-408.
- [13] 刘 宇,徐焕文,姜 静,等. 基于种子活力及苗期生长性状的白桦四倍体半同胞家系初选[J]. 北京林业大学学报,2014,36(2):74-80.
- [14] 孔国辉,刘世忠,吴 彤,等. 油页岩废渣场26种木本植物光合作用和生长的差异[J]. 热带亚热带植物学报,2006,14(6):467-476.
- [15] 潘瑞炽主编. 植物生理学[M]第6版. 北京:高等教育出版社,2008:116-119.
- [16] 杨传平,刘桂丰,魏志刚,等. 白桦强化促进提早开花结实技术的研究[J]. 林业科学,2004,40(6):75-78.
- [17] 刘福妹,姜 静,刘桂丰. 施肥对白桦树生长及开花结实的影响[J]. 西北林学院学报,2015,30(2):116-120.
- [18] Daoust G, Plourde A, Beaulieu J. Influences of crown size and maturation on flower production and sex expression in *Picea glauca* treated with gibberellin A_{4/7}[J]. Tree Physiology, 1995,15(7-8):471-475.
- [19] Anbudurai P R, Mor T S, Ohad I, et al. The ctpA gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994,91(17):8082-8086.
- [20] Russell A W, Critchley C, Robinson S A, et al. Photosystem II regulation and dynamics of the chloroplast D1 protein in Arabidopsis leaves during photosynthesis and photoinhibition[J]. Plant Physiology, 1995,107(3):943-952.
- [21] Kurisu G, Zhang H M, Smith J L, et al. Structure of the cytochrome b₆f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity[J]. Science, 2003,302(5647):1009-1014.
- [22] Scheller H V, Jensen P E, Haldrup A, et al. Role of subunits in eukaryotic Photosystem I[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2001,1507(1):41-60.
- [23] Meng B Y, Tanaka M, Wakasugi T, et al. Cotranscription of the genes encoding two P700 chlorophyll a apoproteins with the gene for ribosomal protein CS14: determination of the transcriptional initiation site by in vitro capping[J]. Current Genetics, 1988,14(4):395-400.
- [24] Nielsen J, Hansen F G, Hoppe J, et al. The nucleotide sequence of the atp genes coding for the F₀ subunits a, b, c and the F₁ subunit δ of the membrane bound ATP synthase of *Escherichia coli*[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1981,184(1):33-39.
- [25] 杨建国. 杨树叶绿体 NADH 脱氢酶基因的克隆与序列分析[D]. 太谷:山西农业大学,2014:19-24.

(责任编辑:张 研)